

530,790

10/530790

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 4 月 29 日 (29.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/036225 A1

(51) 国際特許分類⁷: G01N 33/70, 33/52

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013166

(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 15 日 (15.10.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-300959
2002 年 10 月 15 日 (15.10.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アーク
レイ株式会社 (ARKRAY, INC.) [JP/JP]; 〒601-8045 京
都府 京都市 南区東九条西明田町57番地 Kyoto (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小坂 秀子

(KOSAKA, Hideko) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市
南区東九条西明田町57番地 アークレイ株式会社内
Kyoto (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナー
ズ (IKEUCHI SATO & PARTNER PATENT ATTOR-
NEYS); 〒530-6026 大阪府 大阪市 北区天満橋1丁目8
番30号OAPタワー26階 Osaka (JP).

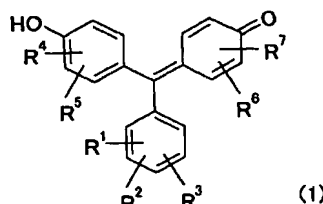
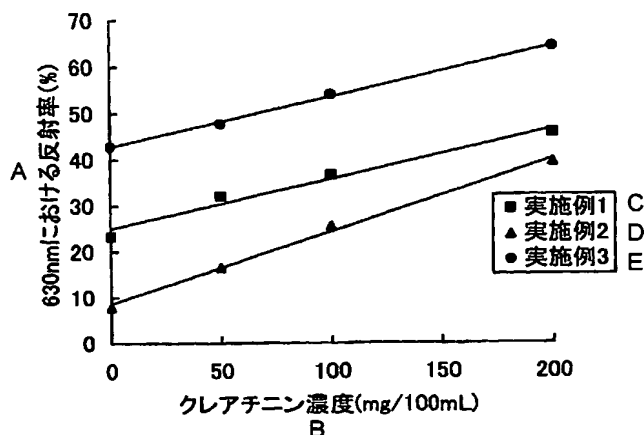
(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許

[続葉有]

(54) Title: TEST STRIP FOR CREATININE DETERMINATION

(54) 発明の名称: クレアチニン測定用試験片



A...REFLECTANCE AT 630nm (%)
B...CREATININE CONCENTRATION (mg/100mL)
C...EXAMPLE 1
D...EXAMPLE 2
E...EXAMPLE 3

(57) Abstract: A novel test strip for the determination of creatinine which is produced by incorporating a compound represented by the general formula (1), a metal capable of reacting with the compound to form a color complex, and a buffer into a porous material. The quantity of creatinine can be determined by measuring optically the quantity of a color complex formed from the compound and the metal and determining the inhibition of color complex formation by creatinine on the basis of the quantity measured above. (1) In the general formula (1), R¹ is H, SO₃X, or COOX; R⁴ and R⁶ are each independently OH, SO₃X, or COOX; R², R³, R⁵, and R⁷ are each independently H, OH, Cl, Br, I, NO₂, NO, or CH₃; and Xs in R¹, R⁴, and R⁶ are each independently H, Na, K, or NH₄.

[続葉有]

WO 2004/036225 A1



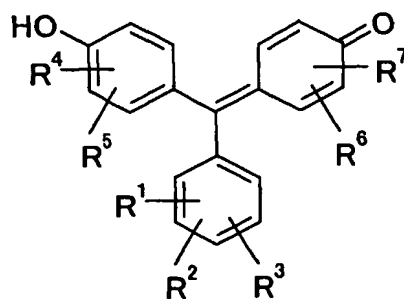
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(57) 要約:

クレアチニンの新たな測定用試験片を提供する。多孔質材に、下記式(1)の化合物、前記化合物と呈色錯体を形成する金属および緩衝剤を含有させ、前記化合物と前記金属とから形成される呈色錯体を光学的に測定し、クレアチニンによる前記呈色錯体の形成阻害の程度を測ることによって、クレアチニン量を測定する。下記式(1)において、 R^1 は、 H 、 SO_3X 、 $COOX$ であって、 R^4 および R^6 は、 OH 、 SO_3X 、 $COOX$ であり、それぞれ同一であっても異なってもよく、 R^2 、 R^3 、 R^5 および R^7 は、 H 、 OH 、 Cl 、 Br 、 I 、 NO_2 、 NO 、 CH_3 であって、それぞれ同一であっても異なってもよく、前記 R^1 、 R^4 および R^6 における X は、 H 、 Na 、 K 、 NH_4 であって、それぞれ同一であっても異なってもよい。



(1)

明 細 書

クレアチニン測定用試験片

技術分野

本発明は、クレアチニンの測定に使用する試験片に関する。

5

背景技術

臨床医療の分野において、腎機能の指標として優れることからクレアチニンの測定が行われている。

- 10 前記クレアチニンの測定方法としては、例えば、化学法や酵素法が一般的である。前記化学法としては、例えば、アルカリ条件下、ピクリン酸と反応して橙赤色に呈色するクレアチニンの性質を利用したヤッフエ (Jaffe) 法 (例えば、ボンズネスおよびタウスキー (Bonsnes and Taussky)、
- 15 参照。) や、ピクリン酸の代わりに 3, 5-ジニトロ安息香酸を使用する Benedict・Behre 法 (例えば、ベネディクトおよびベール (Benedict and Behre)、
- 20 参照。) 等が採用されている。一方、前記酵素法としては、クレアチニンに酵素を作用させてアンモニアを生成し、これを比色法で測定するクレアチニンデアミナーゼ法や、クレアチニナーゼによりクレアチニンをクレアチンに変換し、このクレアチンをサルコシンオキシダーゼやペルオキシダーゼで処理し、比色法で測定するクレアチニンアミドヒドロラーゼ法 (クレアチニナーゼ法) (例えば、タンガネリら (Tanganelli et al.)、
- クリニカル化学 (Clin. Chem)、1982 年、28、p.1461 参照。) 等

が採用されている。

発明の開示

前記ヤッフエ法や Benedict 法は、化学的縮合反応を用いているため、
5 使用する試薬コストは非常に安価である。しかし、この反応は、反応温度を、例えば、35℃以上に上げなければ生じ難いことから、高温で長時間（例えば、10分以上）の反応を必要とする。さらに、強アルカリ条件（pH 11以上）で反応させるため、強アルカリ試薬を使用するので、測定に特別な装置や治具等が必要となり、測定後の廃液処理も大きな問題であった。
10

一方、前記酵素法は、前述の化学法に比べて、例えば、中性付近の温和な条件で反応が進み、クレアチニンに対する特異性も高く、化学法の欠点の大部分が解決されている。しかし、例えば、使用する酵素の価格が非常に高く、また、使用する酵素の種類も多いことから試薬コストが高
15 高く、微量測定ができる特殊な施設以外での測定が困難な状況にある。

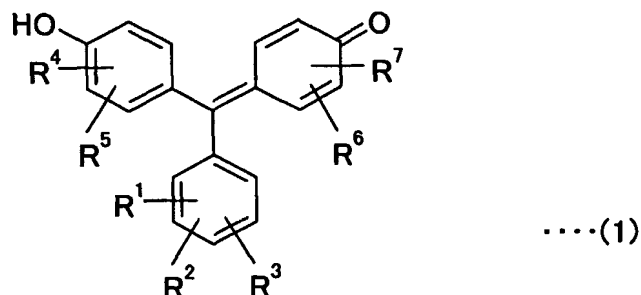
特に近年においては、生活習慣病である糖尿病が世界的に増加しており、これに伴って、その合併症の一つである糖尿病性腎症や、ひいては重篤な腎不全が増加している。そして、このような疾患に対しては、例えば、腎透析や腎移植が必要となるという問題がある。したがって、こ
20 のような腎症、特に糖尿病性腎症を、早期に防止するためにも、腎機能の指標であるクレアチニンを、安全で、しかも迅速かつ簡便に測定する新たな測定方法が望まれている。

そこで、本発明の目的は、クレアチニン測定に使用する試験片の提供である。

25

前記目的を達成するために、本発明のクレアチニン測定用試験片は、

下記式（１）で表わされる化合物を含むクレアチニン測定用試験片である。



5

前記式（１）において、 R^1 は、 H 、 SO_3X 、 $COOX$ であって、 R^4 および R^6 は、 OH 、 SO_3X 、 $COOX$ であり、それぞれ同一であっても異なってもよく、 R^2 、 R^3 、 R^5 および R^7 は、 H 、 OH 、 Cl 、 Br 、 I 、 NO_2 、 NO 、 CH_3 であって、それぞれ同一であっても異なってもよく、前記 R^1 、 R^4 および R^6 における X は、 H 、 Na 、 K 、 NH_4 であって、それぞれ同一であっても異なってもよい。

本発明者は、クレアチニンの新たな測定方法を開発すべく、錯体生成剤と金属との呈色錯体生成反応において、クレアチニンの共存により、競合的に錯体生成反応をおこさせ、前記呈色錯体の退色を利用して、クレアチニン量を測定することを試みた。この結果、前記式に表わされる化合物によれば、クレアチニン非存在の場合は遷移金属との呈色錯体を形成するが、クレアチニンが存在すると、クレアチニンによって前記呈色錯体の形成が阻害され、クレアチニンと前記遷移金属とが非呈色錯体を形成することを、本発明者が初めて見出したのである。したがって、このような化合物を含有させた本発明のクレアチニン測定用試験片によれば、例えば、前記呈色錯体の形成の有無や程度を測定することによって、クレアチニンによる前記呈色錯体の形成阻害の程度がわかり、これ

によって試料中のクレアチニン量を求めることが可能になる。また、本発明の測定用試験片を用いた測定は、例えば、室温での反応が可能であることから、従来の酵素法のように、反応温度を酵素の至適温度に調節する必要もなく、かつ短時間での反応が可能である。このため、測定を
5 迅速かつ容易に行うことができるのである。したがって、本発明の測定用試験片は、特に、腎機能の指標としてのクレアチニンの測定方法として、臨床医療の分野等に有用である。

10 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の実施例における、クレアチニン濃度と反射率との関係を示すグラフである。

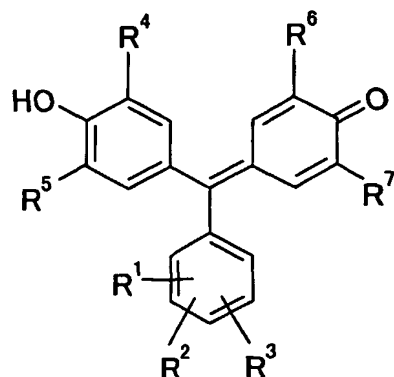
図 2 は、本発明の実施例における、クレアチニン濃度と反射率との関係を示すグラフである。

15

発明を実施するための最良の形態

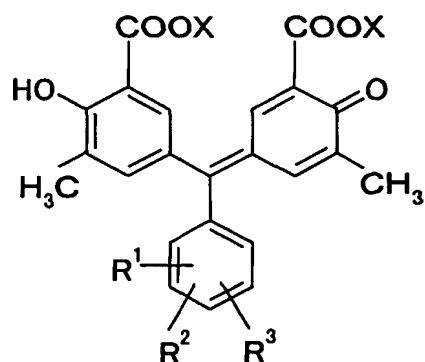
本発明のクレアチニン測定用試験片は、前述のように前記式（１）で表わされる化合物を含む試験片である。

前記化合物としては、例えば、下記式（２）で表わされる化合物が好ましく、より好ましくは下記式（３）で表わされる化合物であり、特に
20 好ましくは下記式（４）で表わされる化合物である。これらの化合物は水溶性であるため、例えば、液体試料等のクレアチニンを測定する場合、反応し易く、より一層優れた感度での測定が可能になる。



.....(2)

前記式 (2) において、 R^1 は、 H 、 SO_3X 、 $COOX$ であって、 R^4 および R^6 は、 OH 、 SO_3RX 、 $COOX$ であり、それぞれ同一であっても異なってもよく、 R^2 、 R^3 、 R^5 および R^7 は、 H 、 OH 、 Cl 、 Br 、 I 、 NO_2 、 NO 、 CH_3 であって、それぞれ同一であっても異なってもよく、前記 R^1 、 R^4 および R^6 における X は、 H 、 Na 、 K 、 NH_4 であって、それぞれ同一であっても異なってもよい。



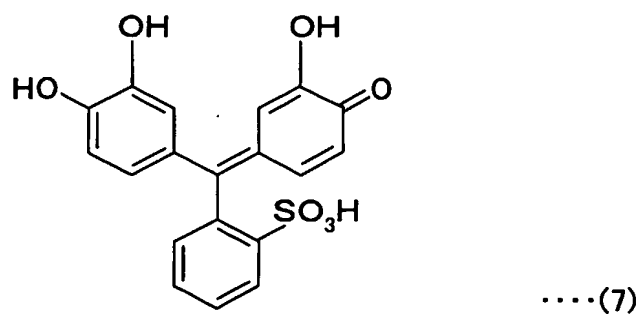
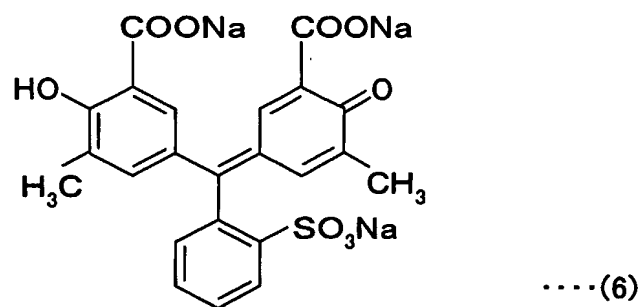
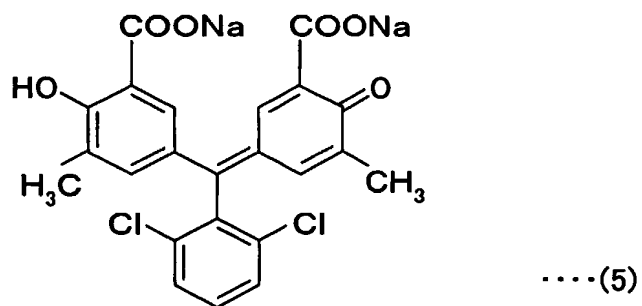
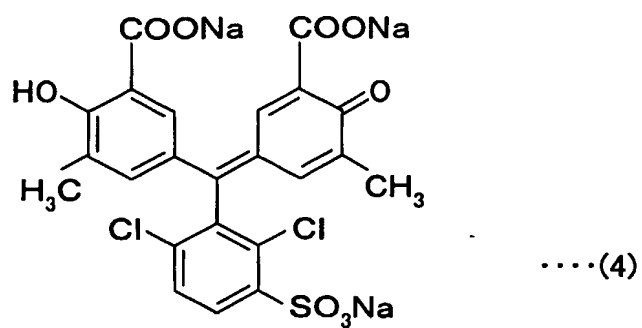
.....(3)

10

前記式 (3) において、 R^1 は、 H 、 SO_3X 、 $COOX$ であって、 R^2 および R^3 は、 H 、 OH 、 Cl 、 Br 、 I 、 NO_2 、 NO 、 CH_3 であって、それぞれ同一であっても異なってもよく、 X は、 H 、 Na 、 K 、 NH_4 であって、それぞれ同一であっても異なってもよい。

15 このような化合物の中でも、下記式 (4) ~ (7) で表わされる化合

物が好ましい。



なお、前記式（４）の化合物名は、２，６-ジクロロ-４'-ヒドロキシ-
３', ３''-ジメチル-３-スルホフクソン-５', ５''-ジカルボン酸三ナト
リウム塩（以下「クロマズロールＳ（Chromazurol S）」という）であり、前
記式（５）の化合物名は、２，６-ジクロロ-４'-ヒドロキシ-３', ３''-
5 ジメチルフクソン-５', ５''-ジカルボン酸二ナトリウム塩（以下「クロ
マズロールＢ（Chromazurol B）」という）であり、前記式（６）の化合物
名は、クロモキサンシアニンＲ（以下「エリクロムシアニンＲ（Eriochrome
Cyanine R）」という）であり、前記式（７）の化合物名は、ピロカテ
コールスルホンフタレイン（以下「ピロカテコールバイオレット（Pyrocatechol
10 violet）」という）である。

前記各化合物の製造方法は、特に制限されず、従来公知の合成方法に
よって製造してもよい。また、前記化合物としては、市販品を使用して
もよく、前記クロマズロールＳは、例えば、商品名 Chrome Azurol S
（ナカライ社製）が、前記クロマズロールＢは、例えば、商品名
15 Chromazurol B（同仁化学社製）が、前記エリクロムシアニンＲは、例
えば、商品名 Eriochrome Cyanine R（ナカライ社製）が、前記ピロカ
テコールバイオレットは、例えば、商品名 Pyrocatechol violet（同仁
化学社製）があげられる。

20 本発明のクレアチニン測定用試験片は、多孔質材が、前記化合物を含
有することが好ましい。

前記多孔質材の種類は、特に制限されず、例えば、ろ紙、ガラスフィ
ルター、樹脂製の多孔質膜等の多孔質材が使用できる。この中でもコス
トや取り扱い性等の理由から、ろ紙が好ましい。また、前記樹脂製多孔
25 質膜の材料としては、例えば、ポリスルホン、ポリエステル、ナイロン、
ニトロセルロース、ポリカーボネート等があげられる。そして、この多

孔質材の平均孔径は、例えば、液体試料が浸透し、保持されればよく、
例えば、 $3 \sim 10 \mu\text{m}$ の範囲である。

本発明のクレアチニン測定用試験片は、さらに前記化合物と呈色錯体
5 を形成する金属またはその塩（以下、「金属」ともいう）を含有するこ
とが好ましい。

前記金属としては、例えば、遷移金属またはこれらの塩が好ましく、
前記遷移金属としては、例えば、Cu (II)、Pd (II)、U (VI)、
Zr (IV)、Ti (IV)、Mn (II)、Fe (III)、Co (II)、N
10 i (II)、Mo (VI)、Sn (IV) 等またはこれらの塩があげられ、こ
の中でも好ましくはCu (II)、Pd (II)であり、より好ましくはP
d (II)である。また、これらの塩としては、ハロゲン化物、硫酸塩の
ような水溶性の高いものが好ましい。

前記化合物と金属との組み合わせとしては、例えば、クロマズロール
15 S とPd (II)との組み合わせ、クロマズロール B とPd (II)との組み
合わせ、エリオクロムシアニン R とCu (II)との組み合わせ、ピロ
カテコールバイオレットとCu (II)との組み合わせ等があげられ、こ
の中でも好ましくは、クロマズロール S とPd (II)との組み合わせで
ある。

20

本発明のクレアチニン測定用試験片は、さらに緩衝剤を含有すること
が好ましい。前記緩衝剤としては、例えば、リン酸塩、ホウ酸塩、酢酸
塩、クエン酸塩、コハク酸塩、トリスヒドロキシメチルアミノメタン等
が使用でき、好ましくは、リン酸塩、ホウ酸塩、酢酸塩であり、より好
25 ましくはリン酸塩である。

本発明のクレアチニン測定用試験片は、例えば、前記式（１）に表わされる化合物と金属とから形成される呈色錯体の安定性を制御できることから、さらに、界面活性剤を含有することが好ましい。つまり、界面活性剤の存在によって前記呈色錯体の安定性を調整できるということは、

5 クレアチニンが存在する場合に、金属と前記化合物との呈色錯体形成よりも、金属とクレアチニンとが錯体を形成する競合反応を起し易くなるため、金属とクレアチニンとの反応性を向上できるということである。このため、クレアチニンの測定をより一層精度良く行うことができる。

前記界面活性剤としては、特に制限されないが、例えば、ノニオン系

10 界面活性剤、アニオン系界面活性剤、およびカチオン系界面活性剤等が使用でき、これらは一種類でもよいし、二種類以上を併用してもよい。

前記ノニオン系界面活性剤としては、例えば、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリビニルピロリドン（PVP）、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、Triton系、Tween系、Br

15 i j系等が使用でき、この中でも好ましくはPVA、Triton-X 100、ポリエチレングリコールであり、より好ましくはポリエチレングリコールである。

前記アニオン系界面活性剤としては、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、コール酸ナト

20 リウム、デオキシコール酸ナトリウム等が使用でき、この中でも好ましくはSDS、コール酸ナトリウムであり、より好ましくはSDSである。

前記カチオン系界面活性剤としては、例えば、臭化ベンジルトリメチルアンモニウム、臭化セチルトリメチルアンモニウム、塩化ベンザルコ

25 ルトリメチルアンモニウム、臭化セチルトリメチルアンモニウムであり、より好ましくは臭化ベンジルトリメチルアンモニウムである。

前述のように界面活性剤は、いずれか一種類でもよいが、二種以上を併用してもよい。その組み合わせとしては、例えば、ノニオン系とアニオン系との組み合わせ、具体的にはPVAとSDSの組み合わせ、ポリエチレングリコールとコール酸ナトリウムとの組み合わせ、Triton-X100とSDSとの組み合わせ等があげられる。また、ノニオン系とカチオン系との組み合わせとしては、例えば、ポリエチレングリコールと臭化ベンジルトリメチルアンモニウムとの組み合わせ、PVPと臭化セチルトリメチルアンモニウムとの組み合わせ等があげられる。

また、界面活性剤は、例えば、前述のように前記式(1)の化合物と金属とから形成される呈色錯体の安定性や、発色性に影響するため、前記化合物および金属の種類に応じて適宜決定することが好ましい。

(実施形態1)

つぎに、本発明について、前記多孔質材に、前記式(1)の化合物、前記金属および緩衝剤を含有させた試験片の一例を示す。

前記多孔質材における各種試薬の含有量は、特に制限されず、試料の量等によって適宜決定できる。具体的な例としては、前記多孔質材の体積 1 cm^3 当たり、例えば、前記化合物が $3 \times 10^{-3} \sim 1.5 \mu\text{mol}$ の範囲、金属が $6 \times 10^{-3} \sim 0.9 \mu\text{mol}$ の範囲、緩衝剤が $9 \sim 45 \mu\text{mol}$ の範囲であり、好ましくは、前記化合物が $0.03 \sim 0.9 \mu\text{mol}$ の範囲、金属が $0.06 \sim 0.45 \mu\text{mol}$ の範囲、緩衝剤が $12 \sim 30 \mu\text{mol}$ の範囲の範囲である。なお、前記多孔質材 1 cm^3 当りに添加する試料の体積は、通常、 $20 \sim 40 \mu\text{l}$ の範囲である。

前記化合物(A)と前記金属(B)との添加割合(モル比A:B)は、例えば、 $30:1 \sim 1:15$ であり、好ましくは $15:1 \sim 1:10$ であり、特に好ましくは $3:1 \sim 1:4$ である。また、化合物(A)と緩

衝剤（C）との添加割合（モル比A：C）は、例えば、1：10～1：1000であり、好ましくは1：20～1：500であり、特に好ましくは1：50～1：200である。

また、さらに界面活性剤を含有する場合は、前記多孔質材の体積1 cm³当たり、例えば、3～600 μgの範囲であり、好ましくは30～300 μgの範囲である。化合物（A）と界面活性剤（D）との添加割合（モル比A：D）は、例えば、50：1～3：1であり、好ましくは30：1～4：1であり、特に好ましくは20：1～5：1である。

このような試験片は、例えば、前記各種試薬を混合した溶液を準備して、前記溶液を前記多孔質材に含浸させ、乾燥することによって調製できる。なお、前記混合溶液のpHは、前記緩衝剤の種類等によって調製でき、例えば、pH5～9の範囲であることが好ましく、より好ましくは6～8の範囲である。このように中性付近に設定できるため、例えば、塩基性物質や酸性物質を含有させる試験片とは異なり、多孔質材が損傷を受けることを防止できる。このため、安定性にも優れた試験片となる。

前記混合溶液における各種試薬の濃度は、例えば、前記多孔質材に保持させる前記各種試薬の設定量に応じて決定できる。例えば、前記化合物が0.1～50 mmol/Lの範囲、金属が0.2～30 mmol/Lの範囲、緩衝剤が0.3～1.5 mol/Lの範囲であり、好ましくは、前記化合物が1～30 mmol/Lの範囲、金属が2～15 mmol/Lの範囲、緩衝剤が0.4～1 mol/Lの範囲である。また、さらに界面活性剤を含有する場合は、例えば、0.01～2重量%の範囲であり、好ましくは0.1～1重量%の範囲である。なお、前記多孔質材に対する前記混合溶液の含浸および乾燥を繰り返し、保持させる量を調整してもよい。

前記混合溶液の溶媒としては、特に制限されず、水、緩衝液等が使用

できるが、前述のように試薬として緩衝剤を含むため、前記緩衝剤を含む緩衝液を溶媒とすることが好ましい。また、例えば、エタノール、メタノール、アセトン等の有機溶媒を含むことも好ましい。

5 なお、予め、前記化合物と金属とを混合した場合、前記両者が反応して呈色錯体が形成されるが、前記混合溶液を多孔質材に含浸させても、クレアチニン含有試料を添加することによる、クレアチニンと金属との錯体形成には問題はない。なぜなら、クレアチニンは、前記両者の呈色錯体の形成阻害のみならず、すでに呈色錯体が形成されていても、この呈色錯体から前記金属を奪い、前記金属と錯体を形成する能力を有する
10 と推測されるからである。

 前述のように、前記混合溶液において、前記化合物と金属とが呈色錯体を形成しても、クレアチニンと金属との錯体形成には影響ない。しかし、予め呈色錯体が形成されることを抑制する場合には、例えば、前記化合物を含む溶液と、金属および緩衝剤を含む溶液とを別個に調製し、
15 前記多孔質材への含浸および乾燥を、各溶液についてそれぞれ行えばよい。具体的には、例えば、クレアチニン測定用化合物を、金属が溶解し難い有機溶媒に溶解し、一方、金属および緩衝剤を水に溶解して水溶液を調製する。そして、前記水溶液を含浸乾燥させた後、前記有機溶媒のクレアチニン測定用化合物溶液を含浸させる。そうすれば、前記化合物
20 と金属とが反応することなく、多孔質材中へ保持させることができる。前記金属が溶解し難い有機溶媒としては、例えば、アセトン、トルエン、エタノール等があげられる。

 また、取り扱い性に優れることから、各種試薬を含有する前記多孔質
25 材を、支持体上に積層してもよい。この場合、前記支持体の材料は特に制限されないが、例えば、透明樹脂等が好ましい。

つぎに、前記試験片を用いて、液体試料のクレアチニン量を測定する一例を説明する。

まず、前記試験片に前記液体試料を滴下して、一定時間反応させる。

- 5 前記液体試料は、前記多孔質材内部に浸透し、これによって、前記多孔質材中の前記化合物と金属とが接触し、呈色錯体を形成する。一方、前記液体試料にクレアチニンが含まれる場合には、前記クレアチニンが、前記呈色錯体の形成を阻害する。このように、前記液体試料におけるクレアチニンの有無および含有量に応じて、多孔質膜内部における前記呈
- 10 色錯体の形成量は異なるため、この呈色錯体の形成の程度が、すなわちクレアチニンの有無または含有量を示すことになるのである。

- 前記反応条件は、特に限定されないが、例えば、反応温度は、10～40℃の範囲が好ましく、より好ましくは20～35℃の範囲であり、反応時間は、30秒～5分の範囲が好ましく、より好ましくは1～3分
- 15 の範囲である。なお、室温以上の温度で反応させる場合は、測定前に、試料をさらに室温に放置しておくことが好ましい。

- 前記反応を行った後、前記呈色錯体の形成の程度、すなわち、クレアチニンによる前記呈色錯体の形成阻害の程度を測定する。これは、例えば、前記試験片を光学的に測定することによって行うことができる。一
- 20 方、予め、既知濃度のクレアチニン標準溶液について、本発明の試験片により、同様にして光学的測定を行い、前記測定値とクレアチニン濃度とをプロットすることによって検量線を作成しておく。そして、前記液体試料についての測定値を前記検量線に代入することによって、試料のクレアチニン濃度を求めることができる。

- 25 前記試験片の光学的な測定方法としては、例えば、反射率の測定や吸光度の測定があげられる。

前記反射率や吸光度の測定波長は、前記化合物と金属とから形成される呈色錯体の種類によって異なるため、例えば、使用する化合物と金属との組み合わせによって適宜決定できる。例えば、クロマズロール S と P d (II) との組み合わせ、クロマズロール B と P d (II) との組み合わせ、エリオクロムシアニン R と C u (II) との組み合わせ、または、ピロカテコールバイオレットと C u (II) との組み合わせの場合、測定波長は、560～700 nm の範囲が好ましく、より好ましくは600～670 nm、特に好ましくは620～650 nm の範囲である。

10 (実施例)

つぎに、実施例について比較例と併せて説明する。

(実施例 1～3)

下記組成 1 の混合液 50 mL、組成 2 の混合液 50 mL および組成 3 の混合液 50 mL を調製し、各混合液にろ紙（厚み 340 mm、商品名
15 Whatman 3 MM Chr：ワットマン社製）を浸漬した。浸漬後の前記ろ紙を 50℃ で約 10 分間乾燥した後、長さ 5 mm×幅 5 mm に裁断し、P E T フィルム上に両面テープで貼り付け、これを試験片とした。組成 1 の混合液を含浸させた試験片を実施例 1 とし、組成 2 の混合液を含浸させた試験片を実施例 2 とし、組成 3 の混合液を含浸させた試験片を実施
20 例 3 とした。なお、前記化合物として、前記式（6）に示す商品名 Eriochrome Cyanine R（ナカライ社製）、前記式（4）に示す商品名 Chrome Azurol S（ナカライ社製）、前記式（5）に示す商品名 Chromazurol B（同仁化学社製）を使用した。

(混合液組成 1)

ホウ酸緩衝液 (pH 9.0)	0.5 M
硫酸銅 (II)	3.0 mM
Eriochrome Cyanine R	6.0 mM

5

(混合液組成 2)

クエン酸緩衝液 (pH 7.0)	0.5 M
塩化パラジウム	8 mM
Chromazurol S	1.5 mM
ポリエチレングリコール	0.5 重量%

10

(混合液組成 3)

ホウ酸緩衝液 (pH 9.0)	0.5 M
塩化銅 (II)	3.0 mM
Chromazurol B	3.0 mM
ポリエチレングリコール	0.1 重量%

15

(クレアチニンの測定)

生理食塩水、生理食塩水にクレアチニン（ナカライ社製）を溶解した
 20 クレアチニン溶液（50、100および200 mg / 100 mL）を、
 それぞれ測定試料として準備した。そして、作製した実施例 1～3 の前
 記試験片を、前記各測定試料にそれぞれ約 2 秒間浸漬した後、引き上げ
 て、室温で 1 分間放置した。そして、これらの試験片について、色差計
 （商品名 Σ 90 ; 村上色彩技術研究所製）を用いて、630 nm におけ
 25 る反射率（単位 %）を測定した。これらの結果を下記表 1 および図 1 に
 示す。図 1 は、クレアチニン濃度と反射率の相関関係を示すグラフであ

る。

(表 1)

		反射率 (単位 ; %)		
5	クレアチニン濃度	実施例 1	実施例 2	実施例 3
	0mg/100mL	2 3 . 3	7 . 9	4 2 . 8
	50mg/100mL	3 2 . 0	1 6 . 6	4 7 . 7
	100mg/100mL	3 6 . 7	2 5 . 5	5 4 . 1
	200mg/100mL	4 5 . 6	3 9 . 4	6 4 . 2

10

前記表 1 および図 1 に示すように、各実施例におけるクレアチニン濃度と反射率との相関式は、実施例 1「 $y = 0.107x + 2.5$ (相関係数 $r = 0.986$)」、実施例 2「 $y = 0.157x + 8.6$ (相関係数 $r = 0.998$)」、実施例 3「 $y = 0.108x + 4.3$ (相関係数 $r =$
 15 0.999)」であった。このことから、クレアチニン濃度と、実施例の試験による反射率とは良好な相関関係が確認できた。

(実施例 4)

測定試料として尿検体を 20 検体準備し、予め、ヤッフエ法の定量試
 20 薬 (商品名クレアチニン-HA テストワコー ; 和光純薬社製) と商品名日立 7070 型自動分析装置 (日立製作所製) とを用いてクレアチニン濃度を測定した。次に、実施例 2 の前記試験片を、前記測定試料に約 2 秒間浸漬した後、引き上げて、室温で 1 分間放置した。そして、これらの試験片について、色差計 (商品名 $\Sigma 90$; 村上色彩技術研究所製)
 25 を用いて、630 nm における反射率 (単位 %) を測定した。

前記各測定試料についての前記ヤッフエ法によるクレアチニン濃度測

定の結果と実施例 2 の前記試験片を用いた反射率測定の結果を、下記表 2 および図 2 に示す。図 2 において、x 軸は、前記自動分析装置による各測定試料のクレアチニン濃度 (mg / 100 ml) を示し、y 軸は、実施例 2 の前記試験片による各測定試料の反射率 (%) を示す。

(表 2)

検体 N o .	クレアチニン濃度		反射率
	(mg/100ml)		(%)
5	1	1 5	7 . 3
	2	3 0	9 . 7
	3	3 8	1 4 . 3
	4	3 9	1 1 . 1
	5	4 4	1 8 . 8
10	6	4 9	2 0 . 0
	7	5 2	1 4 . 6
	8	5 6	2 3 . 1
	9	6 7	1 9 . 3
	1 0	7 3	2 5 . 4
15	1 1	7 4	2 7 . 2
	1 2	8 1	1 8 . 4
	1 3	8 3	2 5 . 8
	1 4	9 1	3 0 . 4
	1 5	1 0 0	2 8 . 2
20	1 6	1 1 6	3 0 . 6
	1 7	1 2 3	3 4 . 6
	1 8	1 5 1	3 7 . 7
	1 9	1 6 3	3 6 . 9
	2 0	1 6 5	3 7 . 6

25 前記表 2 および図 2 に示すように、各測定試料における前記ヤッフエ法で測定されたクレアチニン濃度と、実施例 2 の前記試験片から得られ

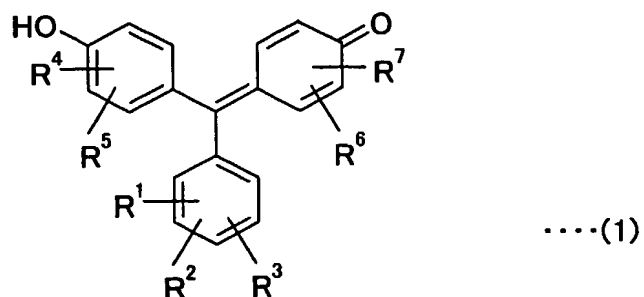
た反射率との関係は、相関式「 $y = 0.201x + 7.4$ （相関係数 $r = 0.938$ ）」で表される良好な相関関係であることが確認された。

産業上の利用の可能性

- 5 以上のように、本発明のクレアチニン測定用試験片は、前述のようなクレアチニン測定用化合物を用いた新たな試験片であり、クレアチニンによる呈色錯体の生成阻害を利用して容易にクレアチニン量を測定することができる。このため、本発明は、前述のような臨床医療等において、腎機能の指標としてのクレアチニン測定に有用である。

請 求 の 範 囲

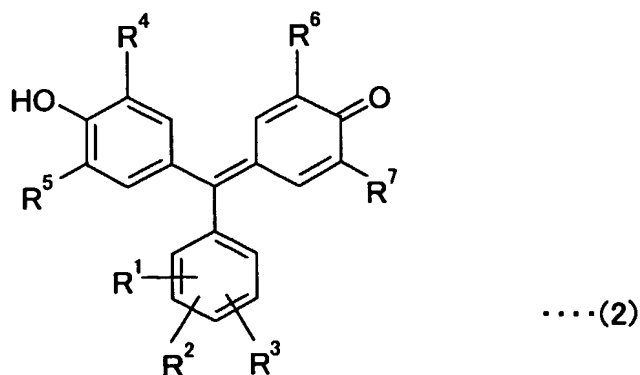
1. 下記式(1)で表わされる化合物を含むクレアチニン測定用試験片。



5

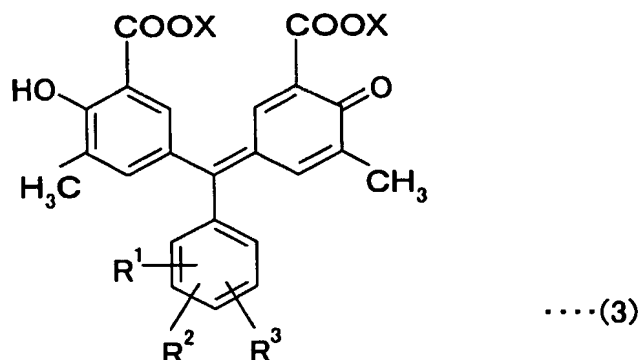
前記式(1)において、 R^1 は、H、 SO_3X 、 $COOX$ であって、 R^4 および R^6 は、OH、 SO_3X 、 $COOX$ であり、それぞれ同一であっても異なってもよく、 R^2 、 R^3 、 R^5 および R^7 は、H、OH、C
 10 l、Br、I、 NO_2 、NO、 CH_3 であって、それぞれ同一であっても異なってもよく、前記 R^1 、 R^4 および R^6 におけるXは、H、Na、K、 NH_4 であって、それぞれ同一であっても異なってもよい。

2. 前記化合物が、下記式(2)で表わされる化合物である請求の範
 15 囲1記載のクレアチニン測定用試験片。



前記式(2)において、 R^1 は、 H 、 SO_3X 、 $COOX$ であって、 R^4 および R^6 は、 OH 、 SO_3X 、 $COOX$ であり、それぞれ同一であっても異なってもよく、 R^2 、 R^3 、 R^5 および R^7 は、 H 、 OH 、 Cl 、 Br 、 I 、 NO_2 、 NO 、 CH_3 であって、それぞれ同一であっても異なってもよく、前記 R^1 、 R^4 および R^6 における X は、 H 、 Na 、 K 、 NH_4 であって、それぞれ同一であっても異なってもよい。

3. 前記化合物が、下記式(3)で表わされる化合物である請求の範囲2記載のクレアチニン測定用試験片。

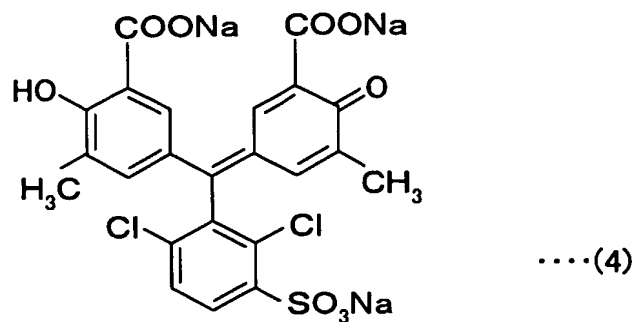


10

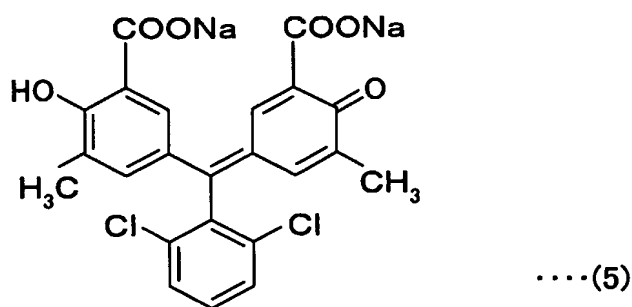
前記式(3)において、 R^1 は、 H 、 SO_3X 、 $COOX$ であって、 R^2 および R^3 は、 H 、 OH 、 Cl 、 Br 、 I 、 NO_2 、 NO 、 CH_3 であって、それぞれ同一であっても異なってもよく、前記 X は、 H 、 Na 、 K 、 NH_4 であって、それぞれ同一であっても異なってもよい。

15

4. 前記化合物が、下記式(4)で表わされる化合物である請求の範囲1記載のクレアチニン測定用試験片。

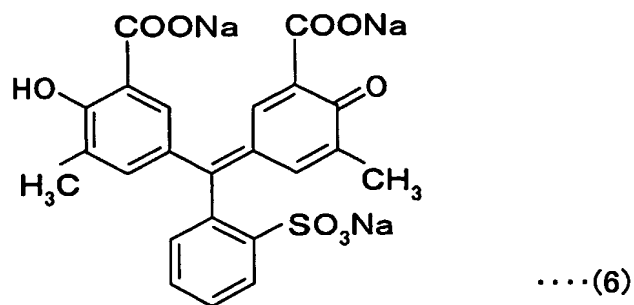


5. 前記化合物が、下記式（5）で表わされる化合物である請求の範囲 1 記載のクレアチニン測定用試験片。



5

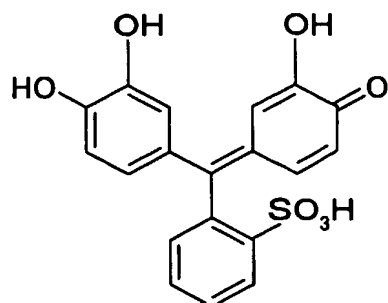
6. 前記化合物が、下記式（6）で表わされる化合物である請求の範囲 1 記載のクレアチニン測定用試験片。



10

7. 前記化合物が、下記式（7）で表わされる化合物である請求の範囲

図 1 記載のクレアチニン測定用試験片。



....(7)

8. 前記化合物が多孔質材に含有された請求の範囲 1 記載のクレアチニン測定用試験片。

9. さらに、前記化合物と呈色錯体を形成する金属またはその塩を含有する請求の範囲 1 記載のクレアチニン測定用試験片。

10. 10. 前記金属が遷移金属である請求の範囲 9 記載のクレアチニン測定用試験片。

11. 前記遷移金属が、Cu (II) および Pd (II) の少なくとも一方である請求の範囲 10 記載のクレアチニン測定用試験片。

15

12. 前記化合物 (A) と前記金属またはその塩 (B) との添加割合 (モル比 A : B) が、30 : 1 ~ 1 : 15 である請求の範囲 9 記載のクレアチニン測定用試験片。

20. 13. さらに、緩衝剤を含有する請求の範囲 1 記載のクレアチニン測定用試験片。

14. 前記化合物(A)と緩衝剤(C)との添加割合(モル比A:C)が、1:10~1:1000である請求の範囲13記載のクレアチニン測定用試験片。

5

15. さらに、界面活性剤を含有する請求の範囲1記載のクレアチニン測定用試験片。

16. 前記化合物(A)と界面活性剤(D)との添加割合(モル比A:D)が、50:1~3:1である請求の範囲15記載のクレアチニン測定用試験片。

10

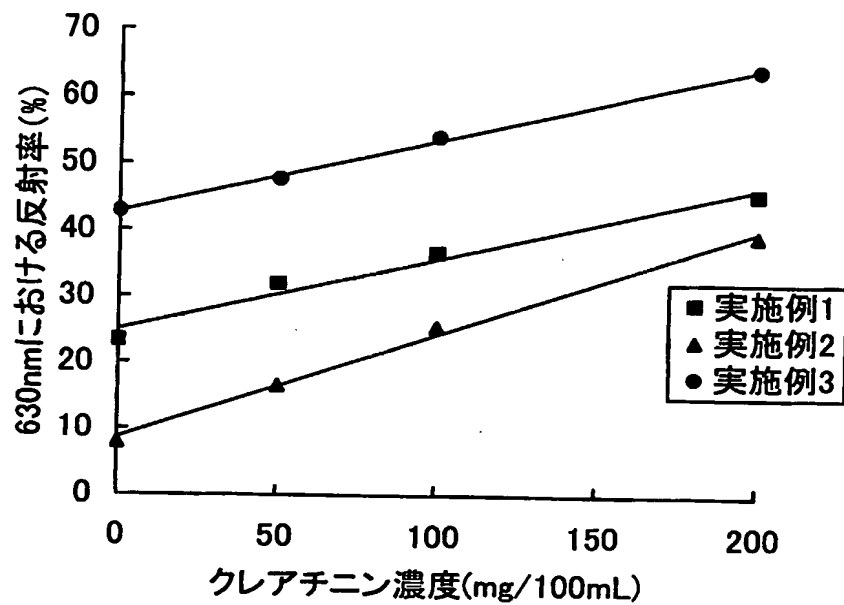


FIG.1

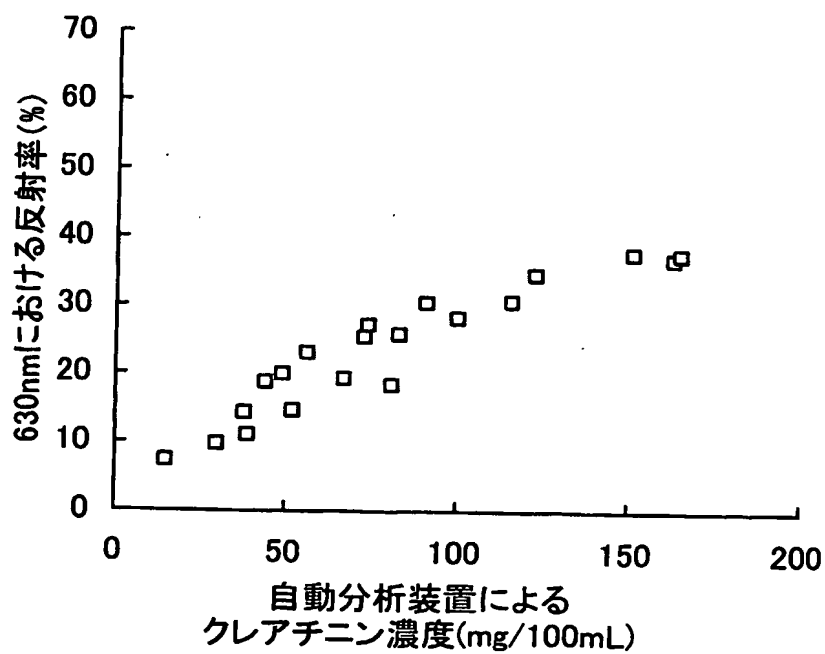


FIG.2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/13166

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/70, 33/52

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N33/70, 33/52

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAS, JOIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 8-105899 A (Bayer Corp.), 23 April, 1996 (23.04.96), & EP 703453 A	1-16
A	JP 7-209304 A (Bayer Corp.), 11 August, 1995 (11.08.95), & EP 658768 A	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 January, 2004 (16.01.04)

Date of mailing of the international search report
03 February, 2004 (03.02.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/70、33/52

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/70、33/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2003年

日本国登録実用新案公報 1994-2003年

日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS、JOIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 8-105899 A (バイエルコーポレーション) 1996. 04. 23 & EP 703453 A	1-16
A	JP 7-209304 A (バイエルコーポレーション) 1995. 08. 11 & EP 658768 A	1-16

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 01. 04

国際調査報告の発送日

2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JPO)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

亀田 宏之



2J

9015

電話番号 03-3581-1101 内線 3251